

ZÁRÓJELENTÉS¹

OTKA – T046694

1., Metodikai fejlesztések

1.1., SNP vizsgálatok

A kutatási periódus alatt összesen 7 gén 10 genetikai polimorfizmusának vizsgálatára állítottunk be módszereket.

A 10 polimorfizmusból 7 meghatározására PCR+RFLP módszert dolgoztunk ki. A polimorf szakaszok amplifikálásához 6 PCR reakció optimalizálását végeztük el (a TLR2 esetében egy PCR terméken helyezkedett el a két polimorf hely). A CD14 polimorfizmusa (C-159T) estében az *AvaII*, a TLR2 Arg752Gln és Arg677Trp polimorfizmusai esetében az *AccI*, a TLR4 Asp299Glu és Thr399Ile polimorfizmusai estében az *NcoI* és *HinfI*, a TGFβ1 C(-509)T polimorfizmusa estében a *Bsu36I*, a T(869)C (Leu10Pro) polimorfizmus esetében pedig az *MspAI* enzimmel hasítottuk a PCR terméket. Agaróz gélen megfuttatva az emésztett PCR termékeket a jellegzetes hasítási mintázat alapján történt a genotípusok azonosítása az adott mintában. A módszerek megbízhatóságát bidirekcionális szekvenálással ellenőriztük.

Az IL-6 G(-572)C, az IL-1β C(-511)T és az IL10 G(-1082)A polimorfizmusok vizsgálatára alkalmas kiteket az Applied Biosystem TaqMan SNP Genotipizáló assay-i közül rendeltük meg és sikerrel használtuk.

1.2., sCD14 izotípusok meghatározása immunoblottinggal

Első lépésben immunoprecipitációval és azt követő poliakrilamid gélelektroforézissel majd blotolással próbálkoztunk majd, hogy egyszerűsítsük a protokollt megfelelően hígított (1:100) szérummintát futtatunk meg, nitrocellulóz membránra blottoltuk és az előhívás biotinnal jelzett poliklonális anti-CD14 antitest és streptavidin-AP konjugátum segítségével történt. Szubsztrátként NBC/BCIP-t alkalmaztunk. Ezzel a metodikával a 48 és 56 kDa-os CD14 sávok jól elválaszthatóak voltak és denzitálás után ezek aránya meghatározható volt.

1.3., FITC-cel jelzett peptidoglikán (PG) készítmény előállítása

Kereskedelmi forgalomban lévő peptidoglikánt jeleztünk FITC-cel karbonát pufferben (pH=9,6) 37°C-on 1 óra alatt, majd a meg nem kötött festéket sómentesítő oszlopon választottuk el a FITC-PG-től. A frakciók peptidoglikán és FITC tartalmát BCA protein assay (Pierce) segítségével illetve fotometriásan határoztuk meg. A jelölés effektivitása 1,9 FITC : 1 PG molekula volt.

1.4., Monocyta és granulocita aktiválódásának jellemzése a CD62L expresszió csökkenése alapján teljes vér rendszerben

A kutatási periódus elején a TLR4 és TLR2 ligandok hatására bekövetkező monocyta aktiváció jellemzésére izolált monocyták TNFα szekréciójának meghatározását végeztük. Ez a protokoll azonban hosszabb inkubálást (16 óra) és citokin ELISA alkalmazását igényelte. A kísérletes rendszer egyszerűsítésére és rövidítésére a későbbiek során teljes vérben lévő sejteket vizsgáltunk és a stimuláció hatására bekövetkező CD62L (L-szelektin) expresszió csökkenését mértük monocytákon. Első lépésben meghatároztuk az alkalmazott direkt jelölt

¹ Az alkalmazott gyakoribb rövidítések: AD: atópiás dermatitis; DM: dermatomyositis; GPI: glikozil-foszfatidil-inozitol; IL: interleukin; LPS: lipoliszaccharid; PDM: a PM-es és DM-es betegek együtt; PG: peptidoglikán; PM: polymyositis; sCD14: szolúbilis CD14; SLE: systema lupus erythematosus; SNP: single nucleotid polymorphism; SSc: systema sclerosis; TGF: transforming growth factor; TLR: toll like receptor.

anti-CD62L antitest telítő koncentrációját. Ezután LPS (TLR4-ligand) és peptidoglikán (TLR2 ligand) különböző koncentrációival stimuláltuk a teljes vérben lévő leukocitákat 30 illetve 60 percig a CD62L jelölés előtt. A monocyták CD62L expressziója kb. 30-50%-kal csökkent 1 ng/ml LPS illetve 5 µg/ml PG jelenlétében 30 perc alatt. Ezeket a paramétereket alkalmaztuk később a betegminták tesztelése során.

1.5., További már működő módszerek

A sejtfelszíni receptorexpresszió vizsgálata monocytákon és a CD14dim+/CD16+ monocyta szubpopulációk arányának meghatározása, a FITC-LPS kötés vizsgálata, a FITC-cel jelölt baktériumok felvételének vizsgálata, a szérumban sCD14 szint mérése áramlási citometriával és az LPS stimulálta TNFα szekréció mérése ELISA-val a pályázat kezdete előtt beállított és már működő módszerek voltak.

2., Vizsgálatok polymyositis/dermatomyositis betegek mintáin

2.1., A sejtfelszíni CD14-expresszió, szérumban sCD14 szint mérése és a sCD14 izotípusok illetve a CD14-C(-159)T polimorfizmus megoszlásának vizsgálata

A CD14/TLR rendszer működése jelentősen befolyásolhatja a perifériás leukocyták és antigénprezentáló sejtek aktivitását, így módosíthatja a veleszületett és adaptív immunrendszer működését. Valóban több olyan autoimmun és immun-mediálta betegség ismert, ami a CD14-expresszió, sCD14 szintek karakterisztikus változásaival jár. Vizsgálataink során két klinikailag sokban hasonló, de patomechanizmusában jelentősen eltérő szisztémás autoimmun betegségben vizsgáltuk meg a CD14-expresszió/sCD14 eltéréseit. Mindkét betegség a proximális izomzat szimmetrikus gyengeségével jár, de míg polymyositisben az izmokat infiltráló sejt elemek okozzák az izomrostok károsodását, addig az ellátó ereket destruáló humorális komponensek felelősek az izomzat pusztulásáért dermatomyositisben.

A PM/DM-es betegek monocytáinak CD14 expresszióját, szérumban sCD14 szintjét, a sCD14 izotípusok megoszlását, valamint a CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának megoszlását vizsgáltuk 76 PM-es, 34 DM-es és végül 40 kontroll mintáin. A PM-es és DM-es betegek vizsgált paraméterei között nem volt szignifikáns különbség, ezért egy populációként kezeltük őket.

Az aktív stádiumban lévő myositis betegek leukocytáinak CD14-expressziója csökkent, míg a szérumban totál sCD14 koncentrációja és az 56 kDa-os izoforma mennyisége szignifikánsan emelkedett. A betegség lefolyását illetően 3 csoportot vizsgáltunk a betegpopuláción belül: monofázisos, policiklusos és krónikus. A totál és az 56 kDa-os sCD14 koncentrációja a krónikus betegcsoportban volt szignifikánsan emelkedett. Ennek magyarázata nagy valószínűséggel az, hogy a vizsgálat időpontjában ebben a szubpopulációban volt a legnagyobb az aktív stádiumú betegek száma. Ugyanis, amikor mindhárom alcsoportban külön vizsgáltuk az aktív és inaktív betegeket a 3 csoport teljesen egyformán viselkedett. Az aktív betegek emelkedett sCD14 szintet mutattak a kontroll populációhoz képest, míg az inaktívak nem, és a 3 szubpopuláció adatai nem tértek el egymástól szignifikánsan. Hasonló eredményt kaptunk, ha az alkalmazott terápia (adjuváns kezelés, szteroid, egyéb immunszuppresszív szerek) alapján képeztünk szubpopulációkat. Az alcsoportok közötti különbségek megszűntek, ha az aktív és inaktív stádiumú betegeket külön kezeltük, és az aktív betegek totál és 56 kDa-os sCD14 szintjei emelkedettek voltak a kontrollokéhoz képest. Ezek az eredmények azt vetik fel, hogy a sCD14, mint pozitív akut fázis fehérje, a betegség aktivitására jellemző marker lehet, amit a szérumban LDH értékekkel mutatott szignifikáns korreláció is igazolt.

A CD14 gén C(-159)T polimorfizmusának megoszlása is érdekes összefüggést mutatott a betegség aktivitásával, a szérumban sCD14 koncentrációjával és a sCD14 izotípusok megoszlásával. A T/T genotípus esetében szignifikánsan magasabb volt a krónikus lefolyású betegek illetve a vizsgálat idején aktív stádiumban lévő betegek száma, továbbá szignifikánsan magasabb volt totál és 56 kDa-os sCD14 koncentrációja ebben a genotípus csoportban a C/C+C/T csoport adataihoz viszonyítva. Ezek az eredmények felvetik annak a lehetőségét is, hogy a T/T genotípusnak és a társuló emelkedett sCD14 szintnek lehet szerepe a betegség aktív stádiumának és esetleg a krónikus betegség lefolyásának a kialakulásában.

Megvizsgáltuk a proinflammatorikus tulajdonságú CD14dim+/CD16+ monocyták arányát is a poly- és dermatomyositis betegek mintáiban, de sem a kontrollokhoz képest sem az egyes betegcsoportok (PM/DM, aktív/inaktív, monofázisos/policiklusos/krónikus) között nem találtunk szignifikáns eltérést.

(Az eredményeket bemutató közlemény bírálata alatt van: Andrea Sümegi, Katalin Dankó, Andrea Ponyi, Gyula Szegedi, Péter Antal-Szalmás. Associations between C(-159)T T/T genotype of the CD14 gene, CD14-expression, serum total and 48/56 kDa sCD14 concentrations and disease activity and course in patients suffering from polymyositis/dermatomyositis. Clinical Immunology.)

2.2., A sejtfelszíni TLR2 és TLR4-expresszió és funkciók, illetve a TLR2 Arg752Gln/Arg677Trp és a TLR4 Asp299Glu/Thr399Ile polimorfizmusok vizsgálata

A genotipizálás során összesen 203 myositiszes beteg és 111 egészséges kontroll TLR2 és TLR4 polimorfizmusainak megoszlását vizsgáltuk meg. A TLR2 Arg677Trp csak homozigóta vad formában fordult elő a betegekben és a kontrollokban is és homozigóta mutáns genotípus egyik polimorfizmus esetében sem volt detektálható. Az Arg752Gln SNP esetében 6,6% illetve 6,4% volt a heterozigóták aránya a kontrollokban és a betegekben. A TLR4 Asp299Glu illetve Thr399Ile heterozigóta genotípusa 6,6% illetve 10,7%-ban fordult elő a myositiszes betegekben szemben a kontrollokban kapott 8,3%-kal. A különbség a heterozigóták arányában a betegek és a kontrollok valamint a különböző betegcsoportok (PM/DM, krónikus/monofázisos/policiklusos lefolyás) között egyetlen SNP esetében sem volt szignifikáns.

A TLR2/TLR4 expresszió, ligandkötés (LPS-FITC és PG-FITC) és TLR-mediálta sejtaktiváció (LPS és PG stimuláció) vizsgálatát 62 beteg és 30 kontroll esetében analizáltuk. A vizsgált TLR2 és TLR4 polimorfizmusok mutáns alléljeinek alacsony aránya miatt nem volt lehetőség heterozigóta genotípusú egyének mintáinak a vizsgálatára, valamennyi donor homozigóta vad genotípusú volt. A sejtfelszíni receptor expresszióban és ligandkötésben nem volt szignifikáns különbség az egyes betegcsoportok és a kontrollok között. Ugyanakkor a monocyták CD62L-expressziója szignifikánsan kevésbé csökkent PG és LPS stimulációra mind a PM mind a DM-es betegek mintáiban a kontrollokhoz képest. Hasonló eredményt kaptunk, ha a betegeket a betegség aktivitása (aktív/inaktív) vagy lefolyása (krónikus/monofázisos/policiklusos) alapján osztottuk alcsoportokba. Minden csoportban kevésbé csökkent a CD62L-expresszió a kontrollokhoz viszonyítva, de az egyes betegcsoportok között nem volt szignifikáns különbség. Ez a jelenség az LPS és a PG stimuláció hatására bekövetkező sejtaktiváció csökkenésére utal általában az idiopathiás gyulladásos myositiszes betegekben. Miután a receptor expresszió és a ligandkötés nem tért el a betegek és a kontrollok között, az észlelt aktivitás csökkenés felvetheti a TLR2 és TLR4 közös intracelluláris szignalizációs elemeinek kóros működését ebben a betegcsoportban.

(Az eredmények közlésre előkészítve.)

2.3., A TGFβ1 C(-509)T és Leu10Pro polimorfizmusok megoszlásának valamint a szérumban TGFβ1 koncentrációjának vizsgálata

Ahogy már korábban is részleteztük a polymyositis és a dermatomyositis (PM/DM) a vázizmok gyengeségével és gyulladásos beszűrődésével járó kórképek, melyek az autoimmun eredetű betegségek közé sorolhatóak. Bizonyos citokinek fokozott expressziója szerepet játszhat e betegségek kialakításában és lefolyásában. Az egyik ilyen citokin a TGFβ1, fokozottan expresszálódik az izombiopsziás mintákban. Génjének több olyan polimorfizmusa ismert, ami befolyásolhatja a TGFβ1 expressziót és asszociációt mutat számos betegséggel.

A két polimorfizmus megoszlását és a szérumban szolúbilis TGFβ1 szinteket 107 egészséges kontroll és 188 PM/DM-es beteg esetében határoztuk meg. A kontrollok eredményei jó egyezést mutattak az irodalmi adatokkal. A betegeknél kapott genotípusokat összevetettük a klinikai adatokkal is (aktivitás, aktivitási markerek: CK/LDH, Jo1-pozitivitás, betegség lefolyása, terápia). Eredményeink azt mutatták, hogy a C(-509)T, promóter-polimorfizmus esetén az inaktív PM illetve inaktív PDM-es betegekben szignifikánsan gyakrabban fordultak elő a mutáns allélt hordozó genotípusok a kontrollokhoz és az aktív PM-es betegekhez képest. A T(869)C polimorfizmus esetén ugyanakkor szignifikáns eltérést találtunk az aktív DM-es betegek és a kontrollok eredményei között. A szérumban szolúbilis TGFβ1 szint szignifikánsan magasabb volt az összes myositises betegben az egészséges kontroll csoporthoz képest, az egyes betegség alcsoportok és a kontrollok között azonban nem volt szignifikáns különbség.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a T(869)C polimorfizmus C/C genotípusa DM-es betegekben, a C(-509)T polimorfizmus C/C genotípusa pedig a PM-es betegekben mutathat összefüggést a betegség aktivitásával, a szérumban TGFβ1 szint pedig általában magasabb a myositises betegekben, ami felveti annak lehetőségét, hogy a megváltozott TGFβ1 szekréció szerepe játszhat az idiopathiás gyulladásos myopathiák kialakulásában illetve a betegség lefolyásában.

(Az eredmények közlésre előkészítve.)

2.4., Az IL-6 G(-572)C, az IL-1β C(-511)T és az IL10 A(-1082)G polimorfizmusok megoszlásának vizsgálata

Összesen 135 poly- és dermatomyositises beteg és 101 egészséges kontroll adatait dolgoztuk fel. Szignifikáns különbséget egyik polimorfizmus esetében sem találtunk a kontrollok és a különböző betegcsoportok (PM/DM, aPDM/iPDM, monofázisos/polyciklikus/krónikus) között. Legszámottevőbb különbség a monofázisos és krónikus betegség-lefolyású myositisisek IL10 A(-1082)G és IL-6 G(-572)C genotípusainak arányában volt. A monofázisos csoportban az IL10 polimorfizmus mutáns allélját tartalmazó genotípusok aránya jóval magasabb (70,4% vs. 52,4%), míg az IL6 polimorfizmus mutáns allélját tartalmazó genotípusok aránya jóval alacsonyabb (5,6% vs. 14,3%) volt, mint a krónikus betegséglefolyású csoportban. Miután a mutáns allél jelenléte mindkét SNP esetében fokozott citokin szekrécióval jár a csökkent anti-inflammatorikus IL-10 és fokozott proinflammatorikus IL6 hatás vélhetően hozzájárulhat a súlyosabb, folyamatosan tünetek mutató betegséglefolyás kialakulásához a krónikus betegek esetében. A különbségek azonban ezekben az esetekben sem voltak szignifikánsak, amihez hozzájárulhat a viszonylag alacsony esetszám (monofázisos beteg: 71 db, krónikus: 21 db), amit újabb betegek bevonásával szeretnénk növelni, javítva ezzel a statisztikai analízis erejét.

3., Vizsgálatok systemas sclerosisos betegek mintáin

3.1., A tesztelt SNP-k megoszlásának vizsgálata és a szérumsCD14 szint mérése systemas sclerosisos (SSc) betegek mintáiban

Valamennyi klinikai adat figyelembe vétele után összesen 85 SSc-os beteg eredményét vontuk be a végső analízisbe és a betegek alcsoportokba való beosztása is módosult kissé. Ezekkel együtt 111 egészséges kontroll mintáit analizáltuk.

A genetikai polimorfizmusok megoszlását illetően az IL10 és az IL6 genotípusok arányában volt szignifikáns eltérés a teljes beteg populáció és a kontrollok adatai között. (IL10 – Kontroll: A/A=38,6% A/G=37,6% G/G=23,8% vs. SSc: A/A=29,3% A/G=56,1% G/G=14,6% $p<0,04$; IL6 – Kontroll: G/G=90,1% G/C=5,9% C/C=4,0% vs. SSc: G/G=84,1% G/C=1,2% C/C=14,6% $p<0,02$). Szignifikáns különbség volt a diffúz cutan scleroderma betegek IL6 genotípusainak a megoszlásában a kontroll csoporthoz képest (dcSSc: G/G=76,2% G/C=0% C/C=23,8% $p<0,005$) de nem volt szignifikáns különbség a limitált cutan forma és a kontrollok illetve a diffúz és limitált cutan formák adatai között sem. Az IL6 SNP esetében a C allél magasabb aránya befolyásolhatja az IL6 termelést és így a fibrótikus folyamat befolyásolásával a betegség kiterjedtségét.

A SSc-os betegekben a kontrollokhoz képest a TLR2 Arg753Gln heterozigóták aránya valamivel kisebb (3,5% vs. 6,4%), a TLR4 Asp299Glu/Thr399Ile heterozigóták aránya kissé magasabb volt (14,1% vs. 8,3%), de ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak. A CD14 genotípusok megoszlása és a szérumsCD14 értékek nem voltak eltérőek a betegek és a kontrollok között. Ugyanakkor a dcSSc-s betegek szérumsCD14 szintje ($2079,4\pm 991,2$ ng/ml, $p<0,04$) szignifikánsan magasabb volt, mint a lcSSc-s betegeké ($1530,8\pm 585,9$ ng/ml). Úgy tűnik tehát, hogy a veleszületett immunrendszer központi mintafelismerő receptorainak genetikai variabilitása nem mutat összefüggést a SSc kialakulásával. A sCD14 akut fázis fehérje így az észlelt koncentrációemelkedés a diffúz formához társuló intenzívebb gyulladásos reakció kísérőjelensége lehet. Ebben a betegcsoportban a szérumsCRP és a vörösvértest süllyedés értékei is szignifikánsan magasabbak voltak.

(Az eredmények közlésre előkészítve.)

4., Vizsgálatok systemas lupus erythematosusos betegek mintáin

4.1., Az SLE-s betegek monocytáinak CD14-expressziójában, CD14-mediált LPS kötésében és az LPS-indukálta sejtaktivációban bekövetkező változások szteroid terápia során

A szisztémás autoimmun betegségek egyik széleskörben alkalmazott gyulladás csökkentő és immunszuppresszív szereit a glükokortikoszteroidok. Ezek hatásmechanizmusát számos publikáció taglalja. Mi korábban több munkánkban is foglalkoztunk ezen szerek további lehetséges hatásaival. Ebben a vizsgálatsorozatban a kortikoszteroid terápia CD14-expresszióra és funkciókra kifejtett hatását vizsgáltuk meg. A kísérletekben 11 egészséges kontroll és 10 terápia mentes systemas lupus erythematosusban (SLE) szenvedő beteg vett részt. Ezek mellett 8 folyamatosan kis dózisú (4-16 mg metyl-prednisolone/nap) szteroid terápiaiban részesülő SLE-s beteg esetében végeztük el a vizsgálatokat, akiknél állapotrosszabbodás miatt pulzus szteroid kezelés (1 g prednisolone 3 napon keresztül) történt. A betegek és kontrollok izolált monocytáinak CD14-expresszióját, CD14-függő és attól független LPS kötését és LPS-indukálta sejtaktivációját (TNF α termelését) határoztuk meg.

Eredményeink azt mutatták, hogy a pulzus szteroid terápia hatására szignifikánsan csökkent a CD14-expresszió és a CD14-mediált funkciók, míg a CD14-független LPS kötés

és sejtaktiváció nem mutatott eltérést. A pulzus szteroid terápia csökkentette a proinflammatorikus tulajdonságú CD14dim+/CD16+ monocyták arányát is. Ezek a változások a szteroid terápia immunszuprimáns hatásának egy új aspektusára világítanak rá, illetve részben magyarázhatják azt is, hogy miért társul gyakran bakteriális fertőzés ehhez a kezelési formához.

(Az eredmények publikálása már megtörtént: Andrea Sümegi, Péter Antal-Szalmás, Magdolna Aleksza, Ildikó Kovács, Sándor Sipka, Margit Zeher, Emese Kiss, Gyula Szegedi. Glucocorticosteroid therapy decreases CD14-expression and CD14-mediated LPS-binding and activation of monocytes in patients suffering from Systemic Lupus Erythematosus. Clinical Immunology, 117:271-279, 2005.)

4.2., A fertőzések és a CD14/TLR expresszió összefüggése SLE-s betegekben

A CD14 és a TLR-ok mintafelismerő receptorként működve szerepet játszanak számos mikrobiális eredetű molekula felismerésében. Minden olyan állapot, ami befolyásolja ezen receptorok aktivitását megváltoztathatja a veleszületett immunrendszer működésének hatékonyságát és a kórokozókkal szembeni védekezés hatékonyságát. A CD14/TLR rendszer és a fertőzések összefüggése kétféleképpen képzelhető el: i, a receptor expresszió/aktivitás csökkenése fertőzésekre való fokozott hajlammal járhat, ii, a lokális/szisztémás fertőzések stimulálják az immunrendszert és így a CD14 és TLR-ok aktivitását is. Ebben a vizsgálatban arra kerestünk választ, hogy SLE-s betegekben a fertőzések előfordulásának gyakorisága mutat-e összefüggést a CD14, TLR2 és TLR4 expresszióval és funkciókkal. Összesen 21 gyakori, antibiotikus kezelést igénylő fertőzéssel jellemezhető és 13 fertőzésre nem hajlamos beteg mintáin végeztünk meghatározásokat. A fertőzéseken gyakran áteső betegek monocytáinak CD14 és TLR4 expressziója szignifikánsan csökkent a fertőzés nélküli betegek adataihoz képest, és különösen kifejezett volt ez a csökkenés a súlyos fertőzésen (pneumónia, endocarditis) átesett betegek esetében. Ezek az eredmények a CD14/TLR expresszió és a fertőzések kialakulása/lezajlása közötti összefüggésre hívják fel a figyelmet.

(Az eredmények közlésre előkészítve.)

5., Vizsgálatok atópiás dermatitises betegek mintáin

5.1., Genotipizálás és a CD14, TLR2, TLR4 és CD180 sejtfelszíni expressziójának vizsgálata atópiás dermatitises betegek mintáiban

Tipikusan gyakran mutat asszociációt az atópiás dermatitis *S. aureus* által mediált bőrfertőzésekkel. A baktériumok jelenléte szerepet játszhat a betegséghez társuló krónikus gyulladásos reakció kialakulásában, a kórokozók komponensei (peptidoglikán, szuperantigének, stb.) ugyanis képesek az immunrendszer aktivitását fokozni. A gyakori bőrfertőzések oka nem teljesen ismert. Az intakt stratum corneum hiánya és az ezzel összefüggő dermális fibronectin receptor expresszió elősegítheti a baktériumok adhézióját, másrészt ismert az atópiás bőr keratinocytáinak csökkent antimikrobiális peptid termelése is. Egy lehetséges további mechanizmus a CD14/TLR rendszer működésének elégtelensége, és ilyen irányban végeztünk vizsgálatokat. A kísérletekben összesen 30 atópiás dermatitises és 56 egészséges kontroll vett részt. A vizsgálatok során a CD14, TLR2, TLR4 és CD180 receptorok sejtfelszíni expresszióját vizsgáltuk a perifériás monocytákon és granulocytákon valamint ezen sejtek CD14-mediálta LPS és baktérium kötő képességét is teszteltük. Ezeken túlmenően megvizsgáltuk a CD14, TLR2 és TLR4 fehérjéket kódoló gének 5 polimorfizmusának megoszlását és a szérumban sCD14 koncentrációját is ebben a betegcsoportban. Eredményeink szerint szignifikáns emelkedés volt kimutatható az atópiás dermatitis intrinsic formájában a monocyták TLR2, TLR4, a granulocyták TLR2, CD14 és a

lymphocyták CD180 expressziójában az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A szérumsCD14 koncentráció ugyanakkor szignifikánsan alacsonyabb volt az extrinsic atópiás dermatitis betegek esetében. A genotípus megoszlásokban, és az egyéb funkcionális tesztekben nem találtunk eltérést.

Az atópiás dermatitishez igen gyakran társulnak bőrfertőzések. A CD14/TLR komplex expressziójának emelkedése az intrinsic formában valószínűleg nem oka, hanem inkább következménye ezeknek a bakteriális infekcióknak. Az atópiás betegek bőrére jellemző megváltozott barrier funkció és fokozódott permeabilitás lehetővé teszi a mikrobák virulencia faktorainak szisztémás transzlokációját, ami a leukociták egy fajta hyperreaktivitásával társulva eredményezi az észlelt celluláris aktivációt ezekben a betegekben.

(Az eredmények publikálása már megtörtént: Andrea Sümegi, Andrea Szegedi, Mónika Gál, János Hunyadi, Gyula Szegedi, Péter Antal-Szalmás. Analysis of components of the CD14/TLR system on leukocytes of patients with atopic dermatitis. International Archives of Allergy and Immunology, 143., 177-184, 2007.)

6., A szerződésben vállaltaktól való eltérések okai

- Miután egyre több adat szól amellett, hogy a CD14/Toll like receptor rendszer szerepet játszhat a természetes és adaptív immunitás kapcsolatának megvalósításában, az adaptív immunrendszer komponenseinek aktiválásában és így az autoimmun betegségek patogenezisében is, ezért a poly- és dermatomyositis betegek mellett, két további szisztémás autoimmun (systemas lupus erythematosus és systemas sclerosis) és egy immunpatomechanizmusú bőrbetegség (atópiás dermatitis) esetében is elvégeztük a tervezett vizsgálatokat.

Ennek megfelelően a funkcionális tesztek elvégzése 110 myositis, 52 SLE-s 30 atópiás dermatitis és 125 egészséges kontroll esetében történt meg.

Az SNP vizsgálatokat 203 myositis, 85 systemas sclerosis, 30 atópiás dermatitis beteg valamint 111 egészséges kontroll esetében végeztük el.

- Az autoimmun betegek terápiájában széleskörben használt kortikoszteroidok hatással lehetnek a veleszületett immunrendszer mintafelismerő receptorainak expressziójára és funkcióira. Új elemként – 18 SLE-s beteg esetében – arra kerestünk választ, hogy a szteroid terápia befolyásolja-e a monocyták CD14-expresszióját és a CD14-mediálta funkciókat.
- A CD14 és a TLR-ok aktivitásának módosulása megváltoztathatja a kórokozókkal szembeni védekezés hatékonyságát, ezért 34 SLE-s beteg esetében a gyakori fertőzőes állapotok és a CD14/TLR4 rendszer változásainak összefüggését is megvizsgáltuk.
- A jelentősen megemelkedett esetszám (mind a genotipizálás, mind a funkcionális tesztek esetében) eredményeképpen megnövekedett költségek miatt a tervezett 19 SNP vizsgálat helyett csak 10 vizsgálata történt meg és a vizsgált betegcsoportoktól meglehetősen idegen vascularis beteganyag analízisét is kihagytuk a programból.
- A kutatási periódus elején a TLR4 és TLR2 ligandok hatására bekövetkező monocyták aktiváció jellemzésére izolált monocyták TNF α szekréciójának meghatározását végeztük. Ez a protokoll azonban hosszabb inkubálást (16 óra) és citokin ELISA alkalmazását igényelte. A kísérletes rendszer egyszerűsítésére és rövidítésére a későbbiek során teljes vérben lévő sejteket vizsgáltunk és a stimuláció hatására bekövetkező CD62L (L-szelektin) expresszió csökkenését mértük monocytákon.

7., Az eredmények felhasználásának, hasznosításának lehetőségei

A kutatási program alapvetően deskriptív, alapkutatás jellegű volt, a 3 autoimmun (PDM, SSc, SLE) és egy immunpatomechanizmusú bőrgyógyászati kórképben (atópiás dermatitis) szenvedő betegek monocytáin a CD14/sCD14/TLR4 komplex és a TLR2 mennyiségének és funkcionális változásainak jellemzését végeztük el. Emellett az ezen fehérjéket kódoló gének illetve pro- és anti-inflammatorikus hatású citokin gének egyes SNP-inek előfordulását vizsgáltuk ezekben a betegekben. A bemutatott eredmények alapvetően a vizsgált kórképek kialakulása és lefolyása során zajló patológiás immunológiai történésekről szolgáltatnak új adatokat. A korábban részletesen diszkutált eredményekből a következőknek lehet gyakorlati jelentősége is:

- A szérumban sCD14 betegség aktivitási marker PDM-ben, és elvileg használható lehetne ezen betegek monitorozása során. Egyértelmű azonban, hogy az izom eredetű enzimek (CK, LDH) illetve a CRP, az akut fázis reakció általános markere, sokkal specifikusabb és szenzitívebb paraméterek és ezeket a sCD14 mérés nem helyettesítheti.
- A vizsgált genetikai polimorfizmus (CD14, C-159T) megoszlása idiopathiás gyulladással myositisben a betegség lefolyásával jellegzetes összefüggést mutatott. Így ezen betegség diagnosztikájában a CD14 genotipizálás a betegség lefolyása és prognózisa szempontjából értékes információt szolgáltat.
- A nagy dózisú kortikoszteroid terápia hatására szignifikánsan csökkent az SLE-s monocyták CD14-expressziója. Ez a jelenség potenciálisan felhasználható lehet a szteroid terápia hatékonyságának monitorozásában és akár az esetleges szteroid rezisztencia vizsgálatában is, azonban ennek a jelenségnek gyakorlati alkalmazása további intenzív kutatómunkát igényel még.

7., Kérelem későbbi újabb elbírálásra

A már megjelent két publikáció mellett egy közlemény anyaga bírálat alatt van egy nemzetközi folyóiratban. Emellett 4 további kísérletes anyag készült el teljesen, melyek eredményeit hamarosan nemzetközi közlemény formájában szeretnénk megjelentetni. Emiatt kérnénk az OTKA bíráló bizottságát, hogy a pályázat eredményességét 1 év múlva újra szíveskedjen megvizsgálni, amikor a folyamatban lévő anyagok publikációja várhatóan megtörténik!